

Eine neue dünnschicht-chromatographische Methode zur Bestimmung von Melamin und Cyanursäure in Milch

Melanie Broszat, Regina Brämer and Bernd Spangenberg

Hochschule Offenburg, Instrumentelle Analytik, Fakultät M+V, www.fh-offenburg.de

Summary

A new quantification method for melamine and cyanuric acid in milk and milk products was developed. For quantification 2 mL milk was diluted with 2 mL THF and 1 g NaCl. The upper phase was applied band-wise (7 mm) on a TLC K60 silica gel 60 foil (No. 1.05554.0001 from Merck, Darmstadt, Germany) in the amount of 10 μ L. The plate was developed in a vertical glass chamber (without chamber saturation) to a distance of 55 mm with the solvent mixture of 2-propanole, CH_2Cl_2 , water (3+1+1, V/V). The plate was dried in a gentle stream of air for 5 minutes and placed in a chlorine containing chamber for 5 minutes. Chlorine was produced from 10 mL KMnO_4 -solution (3 g KMnO_4 in 100 mL of water) and 10 mL HCl (25 mL 32% HCl dissolved in 50 mL of water). Five minutes after mixing the chamber was filled with chlorine and the TLC-plate could be placed. The plate was dipped for 1 sec in starch/iodine reagent. Nitrogen containing zones turn red/brown. To produce the starch/iodine reagent, 125 mg of potassium iodide was dissolved in 12.5 mL of water and 375 mg starch (according to Zulkowsky) was dissolved in 12.5 mL of water. Both solutions were mixed and dissolved with 15 mL of ethanol. Melamine shows an R_F -value of 0.36 and cyanuric acid of 0.56. Application of 10 μ L makes a quantification of melamine below 1 ppm possible.

Einleitung

Melamin hat 2008 weltweit für Schlagzeilen gesorgt. Kannten bis dahin nur Kunststoffchemiker diese Industriechemikalie, so müssen sich heute auch die Lebensmitteltechnologien damit herumschlagen. Melamin fand sich schon 2006 in einer aus China stammenden Lieferung von Weizengluten für Haustierfutter. Die Fütterung führte bei Katzen zum Tod durch Nierenversagen [1]. Chemischen Laien bekannt wurde die erstmals 1834 von Justus von Liebig aus Kaliumthiocyanat und Ammoniumchlorid hergestellte Verbindung dann als illegaler Bestandteil in chinesischer Frischmilch [2].

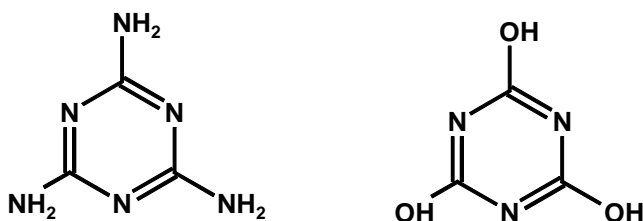


Abbildung 1: Strukturformel von Melamin und Cyanursäure

Melamin (2,4,6-Triamino-1,3,5-triazin, auch als Cyanursäuretriamid bezeichnet) ist eine stickstoffreiche Verbindung, die einen hohen Proteingehalt in Milch vortäuscht, da zur Stickstoffbestimmung in Lebensmitteln weltweit die unspezifische Methode nach Kjeldahl benutzt wird. Diese kann nicht zwischen Melamin-Stickstoff und Protein-Stickstoff unterscheiden. So wird durch Melaminzugabe die Milch gehaltvoller und kann zu einem höheren Preis verkauft werden.

Das Panschen von Lebensmitteln mit Melamin birgt gesundheitliche Gefahren. In saurer Umgebung, wie zum Beispiel in der Niere, wird Melamin in Cyanursäure (2,4,6-Trihydroxy-1,3,5-triazin) umgewandelt. Die Kombination beider Verbindungen schlägt sich in Form unlöslicher Kristalle nieder (Abbildung 2) und kann die Funktion der Niere ganz erheblich stören. Diese für Nieren giftige Wirkung von Melamin führte 2008 in China zum Tode von sechs Säuglingen durch Nierenstein-Bildung. Rund 294.000 Kinder in China erkrankten [2].

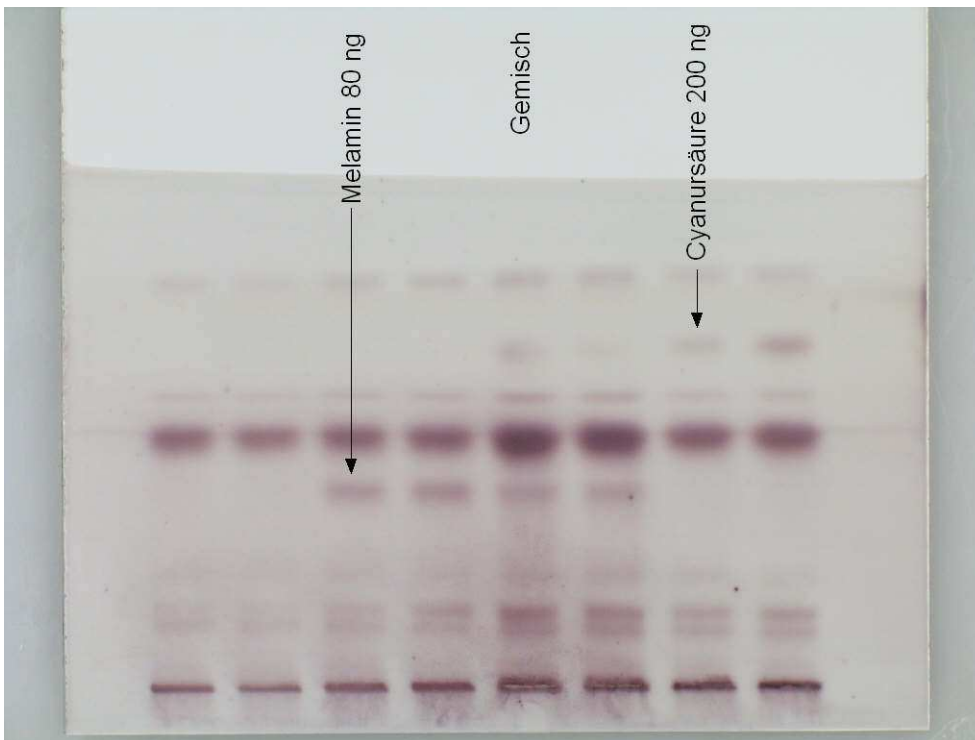


Abbildung 2: Getrennt wurden Frischmilchproben (Bahnen 1 + 2), mit Melamin versetzte Frischmilch (Bahnen 3 + 4), sowie Frischmilch mit Cyanursäure (Bahnen 7 + 8). Auf den Bahnen 5 + 6 wurde Frischmilch aufgetrennt, die sowohl mit Melamin als auch Cyanursäure versetzt war. Sowohl die Melamin- als auch die Cyanurbanden sind hier in ihrer Intensität reduziert. Diese Bahnen zeigen einen Untergrund, der von ausgefallenem Produkt herrührt (Arbeitsbedingungen siehe [4]).

Melamin wurde in Milch und Milchfertigprodukten nicht nur in China, sondern auch in Deutschland, Österreich, Italien und der Slowakei gefunden [3]. Am 25. September 2008 verbot die Kommission der Europäischen Union die Einfuhr aller Milcherzeugnisse für Säuglinge und Kleinkinder aus China. Die WHO hat im Dezember 2008 neue Grenzwerte für Melamin in Lebensmitteln gesetzt. Für Kindernahrung gilt eine Grenze von 1 mg/L, für andere Lebensmittel ein Wert von 2.5 mg/L.

Zur Überwachung dieses Verbotes ist eine preiswerte und verlässlich arbeitende Analytik gefragt, die nicht nur mit der komplizierten Matrix von Milch und Milchprodukten klar kommt, sondern auch in Ländern wie China und Indien flächendeckend eingesetzt werden kann. Unserer Meinung nach ist die Dünnschichtchromatographie (DC) eine verlässliche Methode, um dieses analytische Ziel erreichen zu können.

Experimentelles

Milchaufarbeitung:

2 ml Milchprobe werden mit 2 ml Tetrahydrofuran (THF), sowie 50 µL konzentrierte Essigsäure in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon-Tube) gegeben und gut gemischt. Dann gibt man 1,0 g NaCl pulverförmig zu und lässt die Lösung für 20 min in einem 55° C warmen Wasserbad stehen. Es bilden sich zwei Phasen. Das Zentrifugenröhrchen wird für 5 min bei 5300 U/min zentrifugiert. Von der Oberphase können bis zu 20 µL auf eine Kieselgel-TLC-Platte (K60 silica gel Aluminiumfolie 1.05554.0001 von Merck, Darmstadt) strichförmig aufgetragen werden. Reicht die erzielte Messempfindlichkeit nicht aus, kann 1 mL des Überstandes unter Stickstoff eingeeengt und dann mit 50 µL Wasser und 50 µL THF wieder aufgenommen werden. Von diesem Konzentrat können bis zu 10 µL auf die DC-Platte aufgetragen werden.

Entwicklung der Platte:

Als Fließmittel dient 2-Propanol/Dichlormethan/Wasser (3+1+1) in einer ungesättigten Vertikal-kammer (Trogkammer). Die Entwicklungszeit beträgt 40 Minuten, was einer Laufhöhe von 5 cm entspricht [4].

Sichtbarmachen des Melamins auf der DC-Platte:

Die entwickelte Platte wird für 5 Minuten in eine Doppeltrogkammer gestellt, die Chlorgas enthält. Chlorgas kann einfach aus einer Mischung von 10 ml KMnO_4 -Lösung. (3 g auf 100 ml Wasser) und 10 ml HCl (25 ml 32%-ige HCl, verdünnt mit 50 mL Wasser) hergestellt werden. Nach der Begasung wird die Platte für 1 Minute in einen Luftstrom gestellt, um überschüssiges Chlorgas zu entfernen [5]. Anschließend wird die Platte automatisch für 1 s in frisch angesetztes KI-Stärke-reagenz getaucht. Als Tauchreagenz werden 12,5 ml KI-Lösung (1 g Kaliumjodid in 100 ml Wasser gelöst), 15 ml Ethanol und 12,5 ml Stärke-Lösung (3 g Stärke nach Zulkowsky in 100 ml Wasser gelöst) gemischt [4]. Es bilden sich rote-braune Zonen, die im Bereich von 510 bis 530 nm vermessen werden können.

Ergebnisse

Steht ein neues analytisches Problem zur Lösung an, werden die Kanonen gerichtet. Dann hat man den Eindruck, außer High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in der Kombination mit einem massenselektiven Detektor (MS-Detektor) gibt es überhaupt keine andere Messmethode. So wurde die Quantifizierung von Melamin in Getränken zuerst mit HPLC-MS Methoden durchgeführt [6, 7]. Dass es auch anders geht, zeigt Abbildung 3.



Abbildung 3: Auf Bahn 1 sind 10 µL einer gespikten und wie oben beschrieben aufgearbeiteten Milchprobe (Oberphase) zu sehen, die 1.117 mg Melamin pro Liter Milch enthält. Bahn 2 zeigt die aufgetragene Menge von 20 µL Oberphase, und auf Bahn 3 wurden 10 µL Oberphase mit der gleichen Menge Melamin aufgestockt. Bahn 4 zeigt den Melaminstandard (160 ng Melamin).

Die Menge von 100 µL eines Melamin-Standards (11.173 mg Melamin in 50 mL Wasser gelöst) wurden hier in 20 mL Frischmilch gegeben. Dies entspricht einer Konzentration von 1.1173 mg Melamin pro Liter Milch. Aufgearbeitet, aufgetrennt und angefärbt lässt sich die WHO Grenzkonzentration von Melamin schon mit bloßem Auge erkennen. Solch eine Platte alleine reicht aus, um bei einer Milchprobe Melamin oberhalb des WHO-Grenzwertes für Kindernahrung identifizieren zu können.

Natürlich kann man mit einer solchen Semiquantifizierung nur qualitative Aussagen treffen. Um sicher quantifizieren zu können, bedarf es eines DC-Scanners (Abbildung 4). Eine Standardabweichung von etwa 7% im Endergebnis ist dabei ohne Probleme möglich [4]. Es muss betont

werden, dass diese Messunsicherheit alle analytischen Schritte (inklusive der Probenaufarbeitung) mit einschließt.

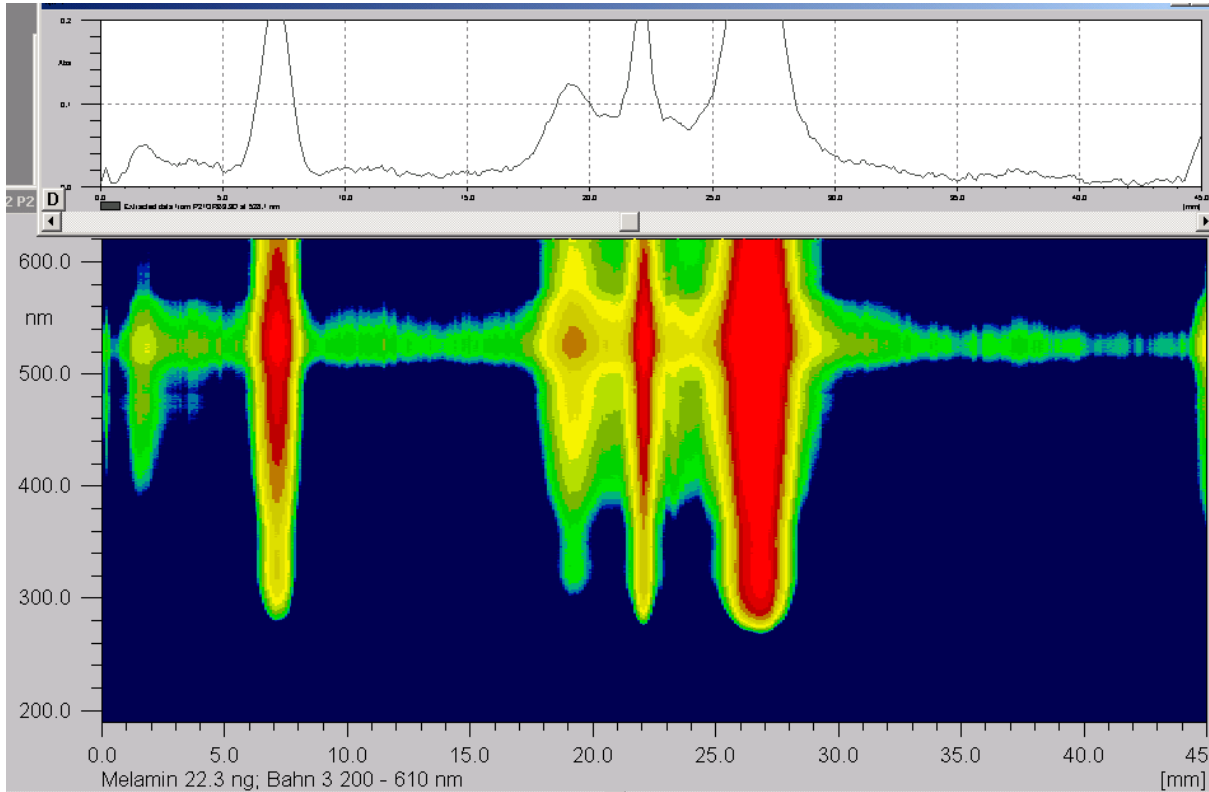


Abbildung 4: Abgebildet ist die Aufnahme der Bahn 3 aus Abbildung 3, gemessen im Bereich von 200 – 600 nm und als Kontourplot dargestellt (aufgenommen mit dem Diodenarray-DC-Scanner TIDAS TLC 2010 der Fa. J&M, Aalen). Das Melamin-Signal ist bei 19 mm Laufhöhe zu sehen und repräsentiert 22.3 ng Melamin. Das Densitogramm einer einzelnen Diode bei 528 nm ist oben ungeglättet dargestellt.

Ist einem der Kauf eines DC-Scanners zu teuer oder kann ein solches Gerät wegen der fehlenden Infrastruktur nicht betrieben werden, reicht auch ein einfaches Programm zur video-densitometrischen Bildauswertung der photographierten DC-Platte aus. In Abbildung 5 ist das mit dem Programm SORBFIL TLC Videodensitometer [8] aus Abbildung 3 gewonnene Densitogramm der Bahn 1 dargestellt. Das Melaminsignal ist bei $R_f=0.36$ deutlich zu erkennen. Fünf Bahnen einer aufgearbeiteten Milchprobe video-densitometrisch ausgewertet, ergeben bei einer Melaminkonzentration von 1.117 mg/L Milch eine relative Standardabweichung über alle Analysenschritte von 11.2 %.

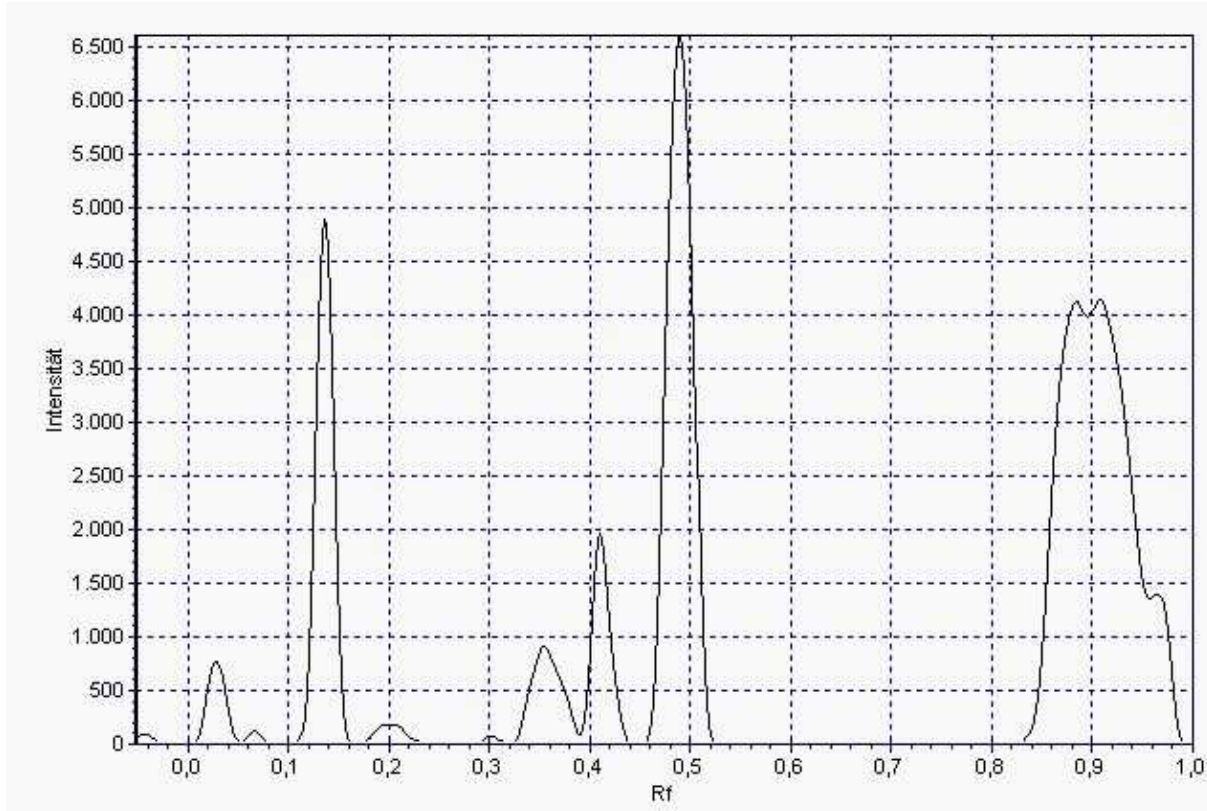


Abbildung 5: Die Bahn 1 aus Abbildung 3 wurde (über 3 Datenpunkte geglättet) und mit dem Programm SORBFIL TLC Videodensitometer (Version 1.8) ausgewertet [8]. Das Melamin-Signal ist bei $R_F=0.36$ zu sehen und steht für die Menge von 11.173 ng Melamin.

Fazit

Die Dünnschichtchromatographie gehört längst nicht zum alten Eisen. Die DC ist eine quantitativ arbeitende Methode, mit der z. B. die WHO-Grenzwerte für Melamin in Milch für einen Bruchteil der Kosten überprüft werden können, die für HPLC-MS Messungen aufgewendet werden müssen.

Literatur

- [1] Cianciolo et al.: "Clinicopathologic, histologic, and toxicologic findings in 70 cats inadvertently exposed to pet food contaminated with melamine and cyanuric acid". J. Am. Vet. Med. Assoc. **233**, (2008), 729-37
- [2] „Vertuscht und verschwiegen: Melamin-Skandal weitert sich aus“ (Zeit Online vom 02. Dezember 2008)
- [3] „Melamin-Milch auch in der Slowakei entdeckt“ (www.heute.de, 4. Oktober 2008)
- [4] Melanie Broszat, Regina Brämer, Bernd Spangenberg, "A new method for quantification of Melamine in milk by absorption Diode-Array Thin-Layer Chromatography", J. Planar Chromatogr. **21** (2008), 469-470
- [5] H. Jork, W. Funk, W. Fischer und H. Wimmer, Dünnschichtchromatographie, Reagenzien und Nachweismethoden, VCH 1989, Band 1a und Band 1b
siehe auch: www.cob.uha.fr/site%20cot/toolbox.php_files/TLC%20bible.pdf
- [6] Ishiwata, H.; Inoue, T.; Yamazaki, T.; Yoshihira, K. "Liquid-chromatographic determination of melamine in beverages", J. Assoc. Off. Anal. Chem. (1987) **70**, 457-460
- [7] T. Sakuma, A. Schreiber, H. Möller-Santner, „Melamin schneller und effizienter analysieren“, www.laborpraxis.vogel.de/analytik/spektroskopie-und-photometrie/massenspektrometrie/articles/154038/
- [8] Sorbfil Videodensitometer: www.sorbfil.com

Zu den Personen

Prof. Dr. Bernd Spangenberg, Studium der Chemie und Promotion an der Philipps-Universität Marburg. Von 1988 bis 1991 Tätigkeit in der Pharmazeutischen Industrie in Deutschland und der Schweiz. Ab 1991 Professor für Umweltanalytik im Fachbereich Verfahrenstechnik an der Hochschule Offenburg. Die Arbeitsschwerpunkte liegen im Bereich der Chromatographie. Bernd Spangenberg ist Editor-in-Chief des Journal of Planar Chromatography – MODERN TLC.

Prof. Dr. rer. nat. Bernd Spangenberg, Hochschule Offenburg, Badstrasse 24, D-77652 Offenburg
E-mail: Spangenberg@FH-Offenburg.de

Regina Brämer, Ausbildung zur Chemisch-Technischen Assistentin am Berufskolleg in Freiburg/Brsg. Von 1986 bis 1990 Labortätigkeit bei der Forstlichen Forschungs- und Versuchsanstalt Baden-Württemberg. Seit 1990 Technische Assistentin im Fachbereich Verfahrenstechnik an der Hochschule Offenburg.

Dipl.-Ing.(FH) Melanie Broszat, Ausbildung zur Technischen Assistentin Agrar- und Umweltanalytik in Stuttgart-Hohenheim. Von 2004 bis 2008 Studium der Verfahrens- und Biotechnik an der Hochschule Offenburg. Seither an der Hochschule innerhalb eines Milchforschungsprojektes angestellt. Die Arbeitsschwerpunkte liegen im Bereich Instrumentelle Analytik.